

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-507410

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成6年(1994)8月25日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 49/02	B	9164-4C	
39/395	D	9284-4C	
	N	9284-4C	
49/02	C	9164-4C	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願平4-511888
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)4月24日
(85) 翻訳文提出日	平成5年(1993)11月4日
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 2 / 0 3 3 1 1
(87) 国際公開番号	W O 9 2 / 1 9 2 7 3
(87) 国際公開日	平成4年(1992)11月12日
(31) 優先権主張番号	6 9 4 , 9 7 7
(32) 優先日	1991年5月6日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)

(71) 出願人	イムノメディックス・インコーポレイテツド アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・ 07950、モーリス・プレインズ、アメリカ ン・ロード・300
(72) 発明者	ゴールデンバーグ、デイビッド・エム アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・ 07078、シヨート・ヒルズ、ロング・ヒ ル・ドライブ・397
(74) 代理人	弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓血管病変の検出

(57) 【要約】

本発明は、アテローム性動脈硬化斑類、血栓類及び塞栓類を含む血管凝血栓類、心筋梗塞、及び、他の器官の梗塞類のような心臓血管病変類を検出及び造影するための試薬及び方法に関する。1種類の白血球に特異的な単一特異的抗体造影用試薬複合体、並びに、少なくとも1種類の白血球、及び、フィブリン、ミオシンもしくは、血小板類に関連する抗原に特異的な多重特異的抗体造影用試薬複合体が、本発明において使用される。フィブリン、ミオシン、及び、血小板関連性抗原からなる群より選択される少なくとも2つの異なる抗原に特異的な多重特異的抗体造影用試薬複合体も提供される。

請 求 の 範 囲

1. 少なくとも1つの造影用試薬に対して複合体形成している、少なくとも2つの異なる実質的な単一特異的抗体もしくは抗体断片の免疫反応性多重特異的複合物を含む心臓血管病変を標的化させるための多重特異的抗体・試薬複合体であって、当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つが1種類の白血球に対して特異的に結合し、かつ、当該抗体の少なくとも一つが、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板類に関連する抗原からなる群から選択される抗原に対して特異的に結合する、多重特異的抗体・試薬複合体。

2. 当該白血球が、顆粒球、単球、B・リンパ球、及び、T・リンパ球からなる群から選択される、請求項1の多重特異的複合体。

3. 各当該抗体もしくは抗体断片が、モノクローナル抗体もしくは断片である、請求項1の多重特異的複合体。

4. 当該実質的な単一特異的抗体断片類が、各々、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fr 、もしくは、一本鎖の抗体断片である、請求項1の多重特異的複合体。

13. 当該心臓血管病変が血栓症もしくは肺塞栓症である、請求項1の多重特異的複合体。

14. 当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つが白血球に対して特異的に結合し、かつ、当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つがフィブリンに対して特異的に結合する、請求項13の多重特異的複合体。

15. 当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つが白血球に対して特異的に結合し、かつ、当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つが血小板もしくは活性化された血小板に対して結合する、請求項13の多重特異的複合体。

16. 当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つが白血球に対して特異的に結合し、当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つがフィブリンに対して特異的に結合し、かつ、当該多重特異的複合体中の第3の抗体もしくは抗体断片が血小板に対して特異的に結合する、請求項13の多重特異的複合体。

17. 請求項1の多重特異的複合体の、標的化及び造影のための有効量を哺乳類に非経口的に注入することを含む心臓血管病変を造影するための方法。

18. 当該造影用試薬が放射性同位体であり、かつ、当該

5. 当該抗体断片類が、各々、モノクローナル抗体の断片である、請求項4の多重特異的複合体。

6. 当該造影用試薬が、50-500 KeVの範囲におけるγ線放出性放射性同位体である、請求項1の多重特異的複合体。

7. 当該放射性同位体が、 $Tc-99m$ 、 $I-123$ 、 $Ga-67$ 、もしくは、 $Te-111$ である、請求項6の多重特異的複合体。

8. 当該造影用試薬が磁気共鳴造影増幅用試薬である、請求項1の多重特異的複合体。

9. 当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つが、 $Ig(DR)$ 抗原に対して特異的に結合する、請求項1の多重特異的複合体。

10. 当該心臓血管病変が、心筋梗塞もしくはアテローム性動脈硬化斑である、請求項1の多重特異的複合体。

11. 当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つが白血球に対して特異的に結合し、かつ、当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つがミオシンに対して結合する、請求項10の多重特異的複合体。

12. 当該白血球が顆粒球もしくは単球のいずれかである、請求項11の多重特異的複合体。

方法が更に、当該病変の部位に当該多重特異的複合体が局在化するのに十分な時間の後、当該病変のシンチグラム法造影を取得することを含む、請求項17の方法。

19. 当該造影用試薬が磁気共鳴造影増幅用試薬であり、かつ、当該方法が更に、当該病変の部位に当該多重特異的複合体が局在化するのに十分な時間の後、当該病変の磁気共鳴造影を取得することを含む、請求項17の方法。

20. 付加的に、当該病変の部位における当該多重特異的複合体の最高の選択的取り込みを可能にさせるために充分な当該多重特異的複合体の投与後の時間において、当該多重特異的複合体もしくはその構成成分に対して特異的に結合する第2の、ラベル化していない抗体もしくは抗体断片を、約0.3から約24時間の期間以内に、当該多重特異的複合体の局在化率を少なくとも約20パーセント増大させるのに充分な量で、被検体に対して非経口的に投与する段階を含む、請求項17の方法。

21. 造影用試薬を心臓血管病変に対して標的化させるためのヒト用の滅菌された注入可能な調製物であって、薬剤学的に容認される滅菌注入賦形剤中に含まれる請求項1の多重特異的複合体を、造影のために有効な量含む調製物。

22. インビボにおける心臓血管病変の検出における用途に適するキットであって、適切な容器内に、少なくとも2つの異なる実質的な単一特異的抗体もしくは抗体断片を含む多重特異的複合物を含み、当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つが1種類の白血球に対して特異的に結合し、かつ、当該抗体の少なくとも一つが、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板に関連する抗原からなる群から選択される抗原に対して特異的に結合し、当該複合物は放射性同位体でラベル化のために修飾されているかあるいは前処理されているキット。

23. 更にスズイオンを含む、請求項22のキット。

24. 当該複合物がキレート化試薬に対して複合体形成している、請求項22のキット。

25. 付加的に、第2容器内に、当該複合物もしくはその構成成分に対して特異的に結合する第2の、ラベル化していない抗体もしくは抗体断片を含む、請求項22のキット。

26. 本質的に、哺乳類に、標的化のための単一特異的複合物の有効量を非経口的に注入する段階を含み、当該複合物が、1種類の白血球に対して特異的に結合する抗体もしくは抗体断片を含み、当該抗体もしくは抗体断片が造影用試薬に対して複

26の方法。

34. 当該抗体もしくは抗体断片がIg(DR)抗原に対して特異的に結合する、請求項26の方法。

35. 当該心臓血管病変が、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化斑、血栓、及び、塞栓からなる群から選択され、かつ、当該造影用試薬がTc-99mである、請求項26の方法。

36. 少なくとも一つの増幅用試薬に対して複合体形成している、少なくとも2つの異なる実質的な単一特異的抗体もしくは抗体断片の免疫反応性多重特異的複合物を含む心臓血管病変を標的化させるための多重特異的抗体・試薬複合体であって、当該抗体もしくは抗体断片の各々が、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板・関連性抗原からなる群から選択される異なる抗原に対して特異的に結合する多重特異的抗体・試薬複合体。

37. 各当該抗体もしくは抗体断片がモノクローナル抗体もしくは断片である、請求項36の多重特異的複合体。

38. 当該実質的な単一特異的抗体断片が、各々、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、もしくは、一本鎖の抗体断片である、請求項37の多重特異的複合体。

合体形成している心臓血管病変を造影するための方法。

27. 当該造影用試薬が放射性同位体であり、かつ、当該方法が更に、当該単一特異的複合体が当該病変の部位において局在化するのに十分な時間の後に、当該病変のシンチグラム法造影を取得することを含む、請求項26の方法。

28. 当該造影用試薬が、50-500 KeVの範囲内にある γ 線放出性放射性同位体である、請求項26の方法。

29. 当該放射性同位体が、Tc-99m、I-123、Ga-67、もしくは、I-111である、請求項28の方法。

30. 当該造影用試薬が磁気共鳴造影増幅用試薬であって、かつ、当該方法が更に、当該単一特異的複合体が当該病変の部位において局在化するのに十分な時間の後に、当該病変の磁気共鳴法造影を取得することを含む、請求項26の方法。

31. 当該白血球が、顆粒球、単球、B-リンパ球、及び、T-リンパ球からなる群より選択される、請求項26の方法。

32. 当該抗体もしくは抗体断片がモノクローナル抗体もしくは断片である、請求項26の方法。

33. 当該実質的に単一特異的抗体断片が、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、もしくは、一本鎖の抗体断片である、請求項

39. 当該抗体断片が、各々、モノクローナル抗体の断片である、請求項36の多重特異的複合体。

40. 当該造影用試薬が、50-500 KeVの範囲内における γ 線放出性放射性同位体である、請求項36の多重特異的複合体。

41. 当該放射性同位体が、Tc-99m、I-123、Ga-67、もしくは、I-111である、請求項40の多重特異的複合体。

42. 当該造影用試薬が磁気共鳴造影増幅用試薬である、請求項36の多重特異的複合体。

43. 当該心臓血管病変が、心筋梗塞もしくはアテローム性動脈硬化斑である、請求項36の多重特異的複合体。

44. 当該心臓血管病変が、血栓症もしくは肺塞栓症である、請求項36の多重特異的複合体。

45. 当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つがフィブリンに対して特異的に結合し、かつ、当該抗体もしくは抗体断片の少なくとも一つが、血小板、活性化された血小板、もしくは、他の血小板抗原に対して結合する、請求項44の多重特異的複合体。

46. 請求項36の多重特異的複合体の、標的化及び造影のための有効量を哺乳類に非経口的に注入することを含む、心

臓血管病変を造影化するための方法。

47. 当該造影用試薬が放射性同位体であって、かつ、当該方法が更に、当該多重特異的複合体が当該病変の部位において局在化するのに十分な時間の後に、当該病変のシンチグラム法造影を取得することを含む、請求項46の方法。

48. 当該造影用試薬が磁気共鳴造影増幅用試薬であって、かつ、当該方法が更に、当該多重特異的複合体が当該病変の部位において局在化するのに十分な時間の後に、当該病変の磁気共鳴造影を取得することを含む、請求項46の方法。

49. 付加的に、当該病変の部位における当該多重特異的複合体の最高の選択的取り込みを可能にさせるために十分な当該多重特異的複合体の投与後の時間において、当該多重特異的複合体もしくはその構成成分に対して特異的に結合する第2の、ラベル化していない抗体もしくは抗体断片を、約0.3から24時間の期間以内に、当該多重特異的複合体の局在化率を少なくとも約20パーセント増大させるのに十分な量で、被検体に対して非経口的に投与する段階を含む、請求項46の方法。

50. 薬剤学的に容認される減菌注入賦形剤中に請求項36の多重特異的複合体の、造影のための有効量を含む造影用試

薬を心臓血管病変に対して標的化させるためのヒト用の減菌された注入可能な調製物。

51. インビボにおける心臓血管病変の検出における用途に適するキットであって、適切な容器内に、少なくとも2つの異なる実質的な単一特異的抗体もしくは抗体断片を含む多重特異的複合物を含み、当該抗体もしくは抗体断片の各々が、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板-関連性抗原からなる群から選択される異なる抗原に対して特異的に結合し、当該複合物は放射性同位体でラベル化のために修飾されているかあるいは前処理されているキット。

52. 更にスズイオンを含む、請求項51のキット。

53. 当該複合物がキレート化試薬に対して複合体形成している、請求項51のキット。

54. 付加的に、第2容器内に、当該多重特異性複合物もしくはその構成成分に対して特異的に結合する第2の、ラベル化していない抗体もしくは抗体断片を含む、請求項51のキット。

明 細 書

心 臓 血 管 病 変 の 検 出

発明の背景

本発明は、アテローム性動脈硬化斑類、血栓類及び塞栓類を含む血管凝血栓類、心筋梗塞、及び、他の器官の梗塞類のような心臓血管病変類を検出しかつ造影するための試薬及び方法に関する。1種類の白血球に特異的な単一特異性抗体-造影用試薬複合体、並びに、少なくとも1種類の白血球、及び、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板細胞類に関連する抗体に特異的な多重特異性抗体-造影用試薬複合体が本発明において使用されている。フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板関連性抗体類からなる群から選択される少なくとも2種類の異なる抗体に特異的な多重特異性抗体-造影用試薬複合体もやはり、本発明において使用されている。

血管内皮に対する障害がある場合には、循環性血液細胞類、特に白血球類が蓄積する。顆粒球類が最も多く濃縮される傾向にあるが、単球類及びリンパ球類も程度は劣るが蓄積する。これらの細胞は血管内皮を通過して損傷領域内に集中する。顆粒球類は血管外空間内でも約3日間までは生き延びるが、その後

は、単核細胞類、単球類、及び、リンパ球類が優勢集団となってくる。

血管障害には2つの段階が関連しており、つまり、初期段階の血管透過性の短期的増大、及び、透過性増大、白血球類、主に顆粒球類の血管壁への付着、血管壁を通過しての主に白血球類の漏出、創傷領域における白血球類の蓄積、白血球の食作用、血管からのフィブリン及び血小板類の漏洩、損傷領域におけるフィブリン沈着、血管破損を伴う血管内凝血化、マクロファージの壊死性組織片の貪食、線維芽細胞類の遊走及び結合組織の形成、及び、毛細血管の内方成長による血管新生からなる、より長期化した第2段階である。白血球類、特に顆粒球類による浸透は、きわめて初期のしかも重大な作用である。

よく発達したアテローム性動脈硬化斑は、炎症性及び修復作用の相互作用の結果生じるものであり、結果的には、細胞外カルシウム塩類、コレステロール性結晶類、グリコサミノグリカン類、及び、血液細胞類及び血漿成分類からなる病変を形成する。動脈壁の内皮透過性はアテローム性動脈硬化の初期段階において誘導され、循環性巨大分子類及び血液細胞類、特に白血球類（及び、主に、顆粒球類）の流入を起こさせる。第二の変

化は、結果的にアテローム性病変を引き起こす、動脈内膜の透過性の減少、及び、血小板類及び／又はフィブリンの後期沈着、増殖、変成、壊死、及び修復段階を伴うことがある。ここで再度述べるが、初期的要素は、損傷領域における白血球類の濃縮及び溢出である。

凝血類に関しては、血管が損傷を受ける際に、フィブリンの形成、血小板類の凝集、及び、その両者の組み合わせにより栓塞が生じることがある。これらの作用中に、血小板凝集に依存しない白血球の付着及び凝集が生じる。フィブリン形成以前の非常な初期にさえ、白血球類の溢出が起こる。

深部静脈血栓症 (DVT) 及び肺塞栓症は全体集団の中でも非常に一般的であり、その他の点では健康な男性及び女性の30%から60%が、そして高危険率を有する患者の80%までもがこれらに冒されている。全病院患者の20%までもが塞栓性血栓形成作用の類に冒されているということが概算されている (Sherry, Semin. Nucl. Med., 7:205-211, 1977)。深部静脈血栓症 (DVT) について一般的に使用されている核医学的検査の多くは、放射線核種静脈造影法に利用する非特異的

放射性調合薬類を必要とする。従って、非浸潤性の外用シンチグラム法による特異的で感度が高くかつ迅速な塞栓類の発見のための、血栓特異的放射性調合薬の必要性は非常に大きい。一般的な放射線学上の方法である対比静脈造影法がDVTについての「金本位」的なものであったが、この方法は副作用の発生率が高く、そのことにより繰り返しての使用が制限されている (Rabinov and Paulin, Arch. Surg., 104:134-144, 1972)。圧縮Bモードの超音波も、脚の血栓類の存在を診断するための用途ではあるが、これは領域限定性のものであり、かつ、病変特異的ではない (Lensing et al., N. Engl. J. Med., 320:342-345, 1989)。従って、放射性調合薬類が、DVTの検出及び診断について簡便さ、迅速さ、及び、特異性を達成することが求められている。

前述の試薬類はDVTには有効であるかもしれないが、生命を危険にさらす病変類である肺塞栓類を発見することができないこともある。それぞれの血栓にはそれぞれの試薬が必要であることがある。静脈血栓類は、主に、血小板類の層と交互に存在する、捕獲されている細胞類を含むフィブリンのポリマー類からできているが、一方で動脈血栓は、主に、より少ないフィ

ブリンを含む凝集血小板類からできている (Freiman: Coleman et al., 編集、鬱血と血栓症・基本的原理及び臨床的診察。New York, NY, Lippincott, 56:766-780 (1982) より)。従って、動脈及び静脈沈着物類の両方に結合することができる放射線調合薬を取得する必要性が存在する。

市販試薬類は、大部分のものについては、Knightにより論評されているように、フィブリン検出用か、もしくは、血小板検出用のいずれかの調合薬類に限定されているようである (Semin. Nucl. Med., 20:52-67, 1990)。

フィブリン特異的放射性調合薬類には、放射性ラベル化フィブリンノーゲン、可溶性フィブリン、抗フィブリン抗体類及び抗体断片類、断片E₁ (架橋結合を形成しているフィブリンの調節的プラスミン消化により作成された、ヒトのフィブリンの60 kDaの断片)、プラスミン (新鮮な血栓類の溶解の原因となる血液中の酵素)、プラスミノゲン活性化因子類 (例えば、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、及び、組織性プラスミノゲン活性化因子)、ヘパリン、及び、フィブロネクテン (450 kDaの粘着性血漿糖蛋白質) がある。

血小板特異的調合薬類には、放射性ラベル化血小板類、抗血

小板抗体類及び抗体断片類、抗活性化血小板類、及び抗活性化血小板因子類があり、これらは、Knight (上述)、並びに、Koblik et al., Semin. Nucl. Med., 19:221-237, 1989、により論評されており、これら全ては、本明細書中に参考文献として取り込まれている。血小板造影は、活性な血小板の凝集が起こる血栓の急性期中には最も有用であり、そのため、これらの、血小板を基にする造影方法類は、24-48時間よりも時間が経っている凝血類を発見することは困難である (Oster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3465-3468, 1985)。他の重要事項は、血小板造影が、患者の治療におけるヘパリン同時投与により阻害されることがあることである (Seabold et al., J. Nucl. Med., 29:1169-1180, 1988)。ヘパリン化は、抗フィブリン抗体類を使用して発見される総病変数をも低減することがある (Alavi et al., J. Nucl. Med., 29:825, 1988)。抗フィブリン抗体類と比較して、放射能ラベル化されている断片E₁は、より初期に凝血類を証明することが明らかである (Knight et al., 前述)。しかしながら、この断片E₁は単離及び調製するのが困難であり、更に、血液凝血類に対する結合は一時的なものである (Knight et al., Radiology, 158:509-

514, 1985)。従って、各々他のものを補い合う、これらの凝血造影用試薬類の2つもしくはそれを上回るものの併用物を含む調製物に対する必要性が依然として存在し、それらの例は、抗フィブリン抗体もしくは抗体断片あるいは断片E₁と抗白血球抗体もしくは抗体断片、及び／又は、抗血小板もしくは抗活性化血小板抗体もしくは抗体断片あるいは抗フィブリン抗体もしくは抗体断片と抗血小板もしくは抗活性化血小板抗体もしくは断片であり、これら全ては適切な方法でラベル化されている。

心筋性虚血もしくは虚血性心疾患の兆候類を含む、心筋層に対する不十分な血液及び酸素供給は、狭窄性アテローム性冠状動脈硬化症の結果生じる一般的な過程である。急性かつ完全な冠状動脈閉塞の結果、重度の虚血が生じ、更にその結果として心筋梗塞が生じる。時間経過については、最初の1時間で、虚血心筋の細胞レベル以下の変化が、ミトコンドリア顆粒類、つまり、グリコーゲン及び呼吸酵素類の低減として現われる。その後、約1時間から6時間で、核染色質の遊走及び凝集化、核喪失及び筋フィラメント構築、及び、顆粒球類による湿潤が観察される。約6から12時間の次の段階では、典型的な虚血壊死が見られる。24時間後には、重度の組織学的変化が容易

に観察され、2・4日目までには、様々なサイズの病巣出血及び毛細血管の拡張に至る。

EKG、クレアチニンキナーゼ（CK-MB）曲線、駆出物分画のような、心筋梗塞（MI）の範囲を診断し、正確な位置決定し、更に、測定するために有用な検査には、全て、何等かの制限という重荷がある。^{99m}Tcピロリン酸もしくは²⁰¹タリウム（TI）を使用する核造影法が、MIを診断及び定量化するために開発されている。昨年、ミオシンに対する抗体類及び抗体断片類が実験用及び臨床用に使用され、虚血障害により非可逆的に損傷を受けた心筋細胞類における局在が証明されている（Khaw et al., J. Nucl. Med. 28:1671-1678, 1987;

Johnson et al., J. Am. Coll. Cardiol. 13:27-35, 1989）。ミオシン抗体の取り込みは、細胞死に特異的であると主張されており（Framie et al., J. Clin. Invest. 72:535-544,

1983）、更に、臨床研究（上述）において、造影が現われる前には少なくとも24時間が必要であることが発見された。従って、抗ミオシン造影法がうまく作用するには、虚血障害の後、少なくとも2日もしくはそれを上回る日数が必要であり、その理由は、まず充分な細胞死が生じて、抗ミオシン抗体結合のた

めに利用することができる充分な抗体部位が結果的に生じる必要があるためである。従って、広範囲の細胞死及び心筋損傷の発生前の診断に役立ち、かつ、抗ミオシン抗体と白血球造影用試薬のそれぞれの特質を兼ね備えることができる一つの試薬もしくは試薬類の配合物に対する必要性が存在する。従って、初期の梗塞もしくはアテローム性動脈硬化斑であるとしても、抗白血球抗体は、例えば、虚血障害後の最初の数時間のうちに造影を行うに充分である。

本発明の目的

本発明の目的は、アテローム性動脈硬化、血栓類及び塞栓類を含む血管凝血類、及び、心筋梗塞類、及び、他の器官の梗塞類のような心臓血管病変の標的化及び初期造影化のための、1種類の白血球に対して結合する、抗体、抗体断片、もしくは、抗体断片・造影用試薬複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、標的対バックグラウンド比の大きい、心臓血管病変類の標的化及び初期造影化のための、少なくとも1種類の白血球に対して選択的に結合し、かつ、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板類に関連する少なくとも1種類の抗原と選択的に結合する、多重特異的抗体、抗体断片、もしくは、

抗体断片複合物・造影用試薬複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、標的対バックグラウンド比の大きい、心臓血管病変類の標的化及び初期造影化のための、フィブリン・ミオシン・もしくは、血小板・関連性抗原類からなる群から選択される少なくとも2つの異なる抗原類に対して選択的に結合する、多重特異的抗体、抗体断片、もしくは、抗体断片複合物・造影用試薬複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、より高い有効性及び増大した標的対バックグラウンド比を有する、心臓血管病変類に対して単一特異的もしくは多重特異的抗体・試薬複合対類を標的化させるための方法を提供することである。

本発明の更に他の目的は、心臓血管病変類のより効率の良い検出のための試薬類及び方法を提供することである。

本発明の更に他の目的は、心臓血管病変類のより初期の検出のための試薬類及び方法を提供することである。

本発明の他の目的は、以下に示す論議と照らし合せれば、この分野における通常の当業者にはより明らかになると思われる。

発明の要約

本発明のこれらの目的及び他の目的は、少なくとも一つの造影用試薬に対して複合体形成を行う単一特異的抗体もしくは抗体断片を含み、当該抗体もしくは抗体断片が1種類の白血球に対して特異的に結合する、心臓血管病変類を標的化及び造影するための、単一特異的抗体・造影用試薬複合体を提供することにより達成される。

本発明の他の目的は、少なくとも一つの造影用試薬に対して複合体形成している、少なくとも2つの異なる実質的な単一特異的抗体類もしくは抗体断片類の免疫反応性多重特異的複合物を含み、当該抗体類もしくは抗体断片類の少なくとも一つが1種類の白血球に対して選択的に結合し、かつ、当該抗体もしくは抗体断片類の少なくとも一つが、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板類に関連する抗原に対して結合する、心臓血管病変類の標的化及び造影のための、多重特異的抗体・試薬複合体を提供することにより達成される。

本発明の他の目的は、少なくとも一つの造影用試薬に対して複合体形成している、少なくとも2つの異なる実質的な単一特異的抗体類もしくは抗体断片類の免疫反応性多重特異的複合物

フィブリン・、ミオシン・、もしくは、血小板・関連性抗原類からなる群から選択される少なくとも2つの異なる抗原類に対して選択的に結合する、種々の心臓血管病変類の標的化及び造影のための、多重特異的抗体・試薬複合体を提供することにより達成される。

本発明は又、前述の単一特異的もしくは多重特異的抗体・試薬複合体の、標的化及び造影のための有効量を哺乳類に非経口的に注入することを含む、様々な心臓血管病変類の造影化のための方法をも提供する。

本発明は更に、前述の単一特異的もしくは多重特異的抗体・試薬複合体類の、標的化及び造影のための有効量を哺乳類に非経口的に注入することを含む、心臓血管病変類の初期診断のための方法をも提供する。

更に、本発明は、前述の方法を実行するための、滅菌済み注射用調製物類及びキット類を提供する。

本発明の詳細な説明

本発明は、アテローム性動脈硬化斑類、血栓類及び塞栓類を含む血管凝血栓類、心筋梗塞類、及び、他の器官の梗塞類のような心臓血管病変類のための、従来の技術による造影法の改良を

を含み、当該抗体類もしくは抗体断片類の少なくとも2つが、フィブリン・、ミオシン・、もしくは、血小板・関連性抗原類からなる群から選択される少なくとも2つの異なる抗原類に対して選択的に結合する、心臓血管病変類の標的化及び造影のための、多重特異的抗体・試薬複合体を提供することにより達成される。

本発明の他の目的は、少なくとも一つの造影用試薬に対して複合体形成している、少なくとも2つの異なる実質的な単一特異的抗体類もしくは抗体断片類の免疫反応性多重特異的複合物を含み、当該抗体類もしくは抗体断片類の少なくとも一つが1種類の白血球に対して選択的に結合し、かつ、当該抗体もしくは抗体断片類の少なくとも一つが、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板類に関連する抗原に対して結合する、種々の心臓血管病変類の標的化及び造影のための、多重特異的抗体・試薬複合体を提供することにより達成される。

本発明の他の目的は、少なくとも一つの造影用試薬に対して複合体形成している、少なくとも2つの異なる実質的な単一特異的抗体類もしくは抗体断片類の免疫反応性多重特異的複合物を含み、当該抗体類もしくは抗体断片類の少なくとも2つが、

提供するが、その理由は、損傷が発生した後の非常に初期に、病理的部位に対する診断用試薬の感度の良い標的化を可能にし、従って、より良い診断及びより初期の治療の実施を可能にするためである。

このましい改良は多重特異的抗体複合物の使用による。この多重特異的標的化抗体複合物は、少なくとも2つの異なる実質的な単一特異的抗体類もしくは抗体断片類を含み、その抗体類もしくは抗体断片類の少なくとも一つが1種類の白血球に対して選択的に結合し、かつ、その抗体類もしくは抗体断片類の少なくとも一つが、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板類に関連する抗原に対して選択的に結合する。従って、この複合物における少なくとも一つの抗原結合部位が最初の白血球細胞種に結合し、一方、同一の標的複合物上の少なくとも第2抗原結合部位が、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板類に関連する抗原に対して結合するものと思われる。白血球類の種類には、顆粒球類、単球類、B・リンパ球類、及び、T・リンパ球類があり、これらは、心臓血管病変類の進行に関与している。

本発明の抗体複合物を作成するのに使用される、実質的に単

一特異的、好ましくはモノクローナルである抗体類の免疫学的特性を調節して、心臓血管病変類に対する結合を至適にさせかつ非標的部位に対する結合を最小にさせることを確実に行うことができる。正しい比率で特異性である場合には、異なる特異性を有する抗体類、抗体断片類もしくは亜断片類、つまり、白血球類、及び、フィブリン、ミオシン、及び、血小板類に関連する抗原類の混合物により、標的部位に到達してゆく注入用量のパーセント率を改善することができる。抗体・試薬複合体の造影用試薬成分は、従って、より高い有効性及び大きい標的対バックグラウンド比を有し、標的部位に局在化している。白血球の浸潤は、心臓血管病変類における非常に初期の過程であるため、この方法により、アテローム性動脈硬化症、虚血性心疾患、凝血類、及び、塞栓類の発生の非常に初期のうちの認識を、他の現行の既知の抗体放射性複合体類もしくは診断用試薬類を使用する場合よりも更に速やかに行うことができる。

本発明に記載されている免疫反応性複合体類は、造影用放射性同位元素、蛍光試薬、コンピュータ制御されている断層撮影法用対比試薬、もしくは、常磁性種（磁気共鳴対比試薬）に対して複合体形成する、単一特異的、2重特異的、3重特異的、

もしくは、より一般的には、多重特異的抗体／断片／亜断片、Fv、もしくは、一本鎖結合性蛋白質類を含むことができる。複合体の抗体成分は、単一の哺乳類種もしくは種の遺伝子工学的結合物（いわゆる人間化させたもしくはキメラ化させた抗体類における、ヒトと齧歯類との結合物のようなもの）の、完全な抗体類、抗体断片類、亜断片類（Fvもしくはそれより小さい結合単位）を使用して作成することができる。抗体類は、例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEのような、任意のクラスの完全な免疫グロブリン、二重もしくは多重抗原あるいはエピトープ特異性を有するキメラもしくはハイブリッド型の抗体類、あるいは、例えば、 $F(a b')_2$ 、 $F(a b)_2$ 、Fab、Fab'、Fv、及び、その類のもののような断片類であることができ、ハイブリッド型断片類を含み、更に、任意の免疫グロブリン、あるいは、例えば、特異的抗原に対して結合して複合体を形成することにより抗体と同様に作用する一本鎖の抗体断片のような、任意の天然、合成、もしくは、遺伝子工学的に作成された蛋白質をも含む。

モノクローナル抗体は本発明における用途に適しており、更に、それらの高い特異性のため好ましいものである。それらは、

免疫原性抗原調製物での哺乳類の免疫化、不死性骨髓腫セルラインでの免疫性リンパ細胞類もしくは脾臓細胞類の融合、及び、特異的ハイブリドーマクローン類の単離のための慣用的な方法であると現在は一般的に考えられている方法により、簡単に調製することができる。種間での融合及び高頻度可変領域類の遺伝子工学的操作のような、モノクローナル抗体類を調製するための、より非慣用的な方法も除外しないが、その理由は、本発明におけるそれらの利用性に影響を与えるものは、主として抗体類の抗原特異性であるためである。純粋なヒトのモノクローナル抗体類の利用も好ましく、その理由は、これが、患者に与える試薬の免疫原性を低減させるためである。

本発明は又、多重特異的抗体・試薬複合体を作成するための抗原特異的断片類の利用も含む。抗体断片類は、慣用的な方法類により、完全な免疫グロブリン類のペプシンもしくはバイン消化により作成することができる。抗体断片類はペプシンを用いた抗体類の酵素的開裂により作成され、 $F(a b')_2$ と表記される5S断片を提供することができることが知られている。この断片を、チオール還元用試薬、更に随意に、ジスルフィド架橋類の開裂から得られるスルフィドリル基の保護基を

使用して更に開裂させることができ、3、5SのFab'一価断片類が作成される。別の方法では、ペプシンを使用する酵素的開裂により、2つの一価Fab断片と一つのFc断片を直接産生する。これらの方法は、とりわけ、Goldenbergにより、米国特許第4,036,945及び4,331,647、及び、それらに含まれている参考文献類において記載されており、これらの特許類は、その全体を本明細書において参考文献として取り込みであり、又、Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys., 89, 230 (1960); Porter, Biochem. J., 73, 119 (1959); 及び、Edelman et al., in "Methods in Immunology and Immunochemistry (免疫学及び免疫化学における方法)", Vol. 1, 422 (Acad. Press, 1967)、においても記載されているが、これらはこの分野における慣用的な方法である。

一価の軽・重鎖断片を形成させるための重鎖の分離、断片の更に進んだ開裂、あるいは、他の酵素的、化学的もしくは遺伝子的な方法のような、抗体を開裂させる他の方法も、それらの断片が、それらの親抗体が作成された抗原に対する特異性を保持している限りは使用することができる。

白血球抗原に対する抗体は、患者種からの白血球で宿主を接

種することにより作成することができる。例えば、ヒトにおける用途のための抗体は、ヒトの白血球でマウスもしくは他の哺乳類種を免疫化することにより作成できる。抗ヒト白血球血清を宿主から回収し、更に、親和性精製を行って、複合物を作成するためのポリクローナル抗体を提供することができる。別の方法では、脾臓細胞を免疫化させた宿主から取り出し、体性細胞のハイブリッド形成技術を使用して適切な腫瘍セルラインと融合させて、抗白血球抗体を産生するハイブリドーマを産生させることができる。これらのハイブリドーマを単離し、サブクローン化させ、更に、培養して、モノクローナル抗体を産生させることができる。

白血球抗原を認識し、それに対して結合するモノクローナル抗体もしくは断片類は、市販品として入手することが可能であり、あるいは、体性細胞のハイブリッド形成技術類から作成することができ、この技術は、始めに Kohler, B.、及び、Milstein, C., *Nature* (1975) 256:495-497、により記載され、更に、「モノクローナル抗体 (Monoclonal Antibodies)」, Kennell, T.J., et al., 編集、Plenum (1980)、において詳細に論議されている。市販品として入手することが可能な白

血球抗原に対するモノクローナル抗体は、正常なTリンパ球に対して結合するOKT 抗T細胞モノクローナル抗体 (Ortho Pharmaceutical Company社から入手することができる)、ATCC 受託番号HB44、HB55、HB12、HB78、及び、HB2 を有するハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体C7E11、W8E7、HXP15 及びG022 (Beckton Dickinson社)、HEN9.4 (New England Nuclear 社)、及び、FMCI1 (Sera Labs 社) により代表される。

Immunotech社 (Marseille、フランス、Pel Freese, Brown Deer, WI, USA を含む世界的な流通機構を有する) のカタログには市販品として入手することができるモノクローナル抗白血球抗体類が列挙されており、それらの多くのものが本発明に記載されている複合物類もしくは治療用試薬類を調製するのに適している。これらには、T細胞類、活性化T細胞類、B細胞類、単球類、及び、顆粒球類に特異的に結合する抗体があり、それらの亜集団もここに含まれる。特定の抗体類は、1種類を上回る白血球、例えば、単球類と顆粒球類、B細胞類と顆粒球類、T細胞類とB細胞類、T細胞類と顆粒球類、T細胞類と単球類と顆粒球類とB細胞類等に共通な抗原類に対して結合する。

Immunotech社により産生されかつ流通される抗体は、よそから入手することができるクローンからの他の抗体に類似している。

適切な抗T細胞抗体類には、CD1、CD2、CD4、CD6、CD7、もしくは、CD8 抗原に対して結合する抗体類がある。好ましい抗T細胞抗体類は、CD3 抗原及びCD5 抗原に対して結合する抗体類である。単球と顆粒球の両方の抗原に対して結合する好ましい抗体は、特に、CDW14 抗原に対して結合するモノクローナル抗体である。B細胞類に対して結合する好ましい抗体類には、CD19もしくはCD21抗原に対して結合する抗体類がある。活性化されたT細胞類に対して結合する抗体類には、CD25もしくはCD26抗原に対して結合するモノクローナル抗体類がある。これらのCD抗原は、抗体類が特別な白血球特異性を有することを定める白血球決定基である。同一のCD抗原上の同一のエピトープに対して結合する一対の抗体は、同一種の白血球に対して交差・遮断結合 (cross-block binding) を行う。単球類、Bリンパ球類、及び、活性化されたTリンパ球類に共通なIa (HLA-DR) 組織適合性抗原に対して特異的に結合する抗体類は、抗HLA-DRクラスII抗体類として分類され、かつ、これらは特定の適用法にとって特に有用なものである。

市販品として入手することができる白血球抗原類に対するモノクローナル抗体類は、典型的には、マウスもしくはラット起源のものであり、かつ、典型的には、IgG 類もしくはIgM 類であるが、本発明に記載されている複合体類を調製することにおける用途に適する抗体類は、種もしくはIgクラスに関して限定することを意図しない。一般的に、抗体類は、通常、現在当業者に良く知られている多くの慣用的な技術を使用して、多くの抗原に対して作成することができる。哺乳類の体内における心臓血管病変において十分な濃度で見い出される白血球抗原に対して結合する任意の抗体を使用して、本発明のための、標的化用多重特異的抗体複合物を作成することができる。

比較的高い免疫反応性、つまり、少なくとも約 10^5 #/モル、好ましくは少なくとも約 10^7 #/モルの白血球抗原についての結合係数、及び、高い免疫反応性、つまり、少なくとも約40%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70-95%の白血球抗原についての免疫反応性を有する抗体を使用することが一般的には望ましい。

本発明においては、特定の適用法については、幾分低めの結合係数を有する抗体を使用することが望ましいことがある。高

い結合係数を有する抗体は、損傷の部位における白血球にばかりでなく、循環系、骨髓、もしくは、正常組織中に存在する白血球に対しても結合してしまうことがありうる。一方、より低い結合係数を有する抗体は、ある種の質量作用効果 (mass action effect) のおかげで、病変の部位、主に濃縮された白血球病巣に付着する傾向にある。これは、造影用ラベル物の早すぎる浄化及び非標的付着を低減するものと思われる。

フィブリン及び血小板抗原に対する現行の抗体の説明は、Knight, Semin. Nucl. Med., 20:52-67 (1990)に掲載されており、これは、本明細書中に参考文献として取り込まれている。抗ミオシン抗体類は、Khaw et al., J. Clin. Invest., 58: 439-446, 1976; Khaw et al., Hybridoma, 3:11-23 (1984)、において記載されており、これは、本明細書中に参考文献として取り込まれている。

造影用の抗体複合物類は、官能基間の単純なグルタルアルデヒド結合からより洗練されかつ特異的な結合までの範囲にわたり、様々な慣用的な方法により調製することができる。この抗体類及び／又は抗体断片類は、好ましくは、もう一方のものに対して共有結合で結合させられており、結合は直接的に、ある

いは、短いもしくは長いリンカー部分を介して、あるいは、抗体／断片上の1つもしくは複数の官能基類を介して行われ、その官能基の例は、アミン、カルボキシル、フェニル、チオール、もしくは、ヒドロキシル基である。グルタルアルデヒドに加えて様々な慣用的リンカーを使用することができ、それらの例は、ジイソシアン酸エステル類、ジイソチオシアン酸エステル類、ビス(ヒドロキシスクシンイミド)エステル類、カルボジイミド類、マレイミド・ヒドロキシスクシンイミドエステル類等である。

方法は簡便であり、グルタルアルデヒドの存在下において抗体／断片を混合させて、抗体複合物を形成させる。最初のSchiff塩基結合を、例えば、第二アミン類に対する水素化ホウ素還元により安定化させることができる。この方法は、慣用的には、例えば、免疫組織化学的用途もしくは免疫アッセイのためのパーオキシダーゼ・抗体複合体のような、他の蛋白質複合体を調製するのに使用されている。ジイソチオシアン酸エステルもしくはカルボジイミドを、非部位特異的リンカーとしてグルタルアルデヒドの代わりに使用することができる。

二重特異的抗体類は様々な慣用的方法により作成することが

でき、それらの方法の例は、完全なIgGもしくは、好ましくはF(a b')₂断片類の混合物のジスルフィド開裂及び再構成、1つを上回る特異性を有する免疫グロブリン類を産生するポリオマー類を形成するための1つを上回るクローンの融合、及び、遺伝子操作によるものである。この二重特異的抗体類は、白血球と他の細胞類、もしくは、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板類のような、心臓血管病変類に関連する蛋白質類との複合物類に対して結合することができる。二重特異的抗体類は又、フィブリン、ミオシン、もしくは、血小板・関連性抗原類からなる群より選択される2つの異なる抗原類に対しても結合することができる。二重特異的(「ハイブリッド」)抗体断片類は、異なる抗体類の還元的開裂の結果生じるF(a b')断片類の酸化的結合により調製されている。これらの一部分は、もともとの抗体を作成した抗原の両方のものに対して特異的な断片を含んでいるものと思われる。これは、2つの異なる抗体のペプシン消化により産生される2つの異なるF(a b')₂断片を混合し、還元的に開裂させてF(a b')断片の混合物を作成し、その後、ジスルフィド結合の酸化的再構成を行い、もともとの抗原類の各々に対して特異的なF(a b')部分を含有

ハイブリッド断片を含むF(a b')₂断片の混合物を作成することにより、都合よく行われる。このようなハイブリッド抗体断片類を調製する方法は、Felleman、「生物学及び医学におけるラベル化抗体類(Labeled Antibodies in Biology and Medicine)」、ページ321-323 (McGraw-Hill Int. Bk. Co., New York et al., 1978); Hisonoff et al., Arch Biochem. Biophys., 93, 470 (1961);及び、Hammerling et al., J. Exp. Med., 128, 146 (1968);及び、米国特許4,331,647において開示されている。

より選択的な結合は、マレイミド・ヒドロキシスクシンイミドエステルのようなヘテロ二官能性リンカーを使用することにより達成することができる。後者のものと抗体／断片との反応は、抗体／断片上のアミン基類を誘導化するものと思われ、更にその後、その誘導物は、例えば、遊離した状態のスルフヒドリル基を有する抗体F(a b')断片(あるいは、より大きい断片、もしくは、例えば、Trautの試薬により付加が行われているスルフヒドリル基を有する未処理の免疫グロブリン)と反応することができる。このようなリンカーは同一抗体内の基に交差結合しそうもなく、結合の選択性を改善する。

抗原結合部位から遠く離れている部位で抗体類／断片類を結合させるのが都合がよい。これは、例えば、先に記載したように、開裂させた鎖内スルフヒドリル基に対する結合のようなものにより実行することができる。他の方法は、炭水化物部分が酸化されている抗体を、少なくとも1つの遊離アミン官能基を有する他の抗体と反応させることを含む。この結果、例えば、水素化ホウ素還元による第二アミンへの還元により安定化させられていることが好ましい、もともとのSchiff塩基（イミン）結合が生じて、最終複合物を形成する。このような部位特異的結合は、小さな分子もしくはポリペプチドについてあるいは固体相ポリマー支持体については、米国特許4,671,958において、更に、より大きな付加物（addend）については、米国特許4,699,784において開示されている。

本発明の様々な種類の二重特異的抗体複合物の中には、以下に記載するものが含まれており、これらは特定の適用法に特に有用であり、それはつまり、心筋梗塞類及びアテローム性動脈硬化斑の検出のための、白血球類及びミオシンに対して特異的な抗体／断片の複合物である。従って、一般的な目的のMI造影のためには、抗ミオシン抗体と抗白血球抗体との組合せ型調製

$F(ab')_2$ 断片のような複数の抗体及び／又は抗体断片を他の1つに結合させて、多重特異的複合物を形成させることができる。二重特異的複合物を、3番目、4番目、もしくは、それより後の白血球細胞タイプ、あるいは、ミオシン、フィブリン、もしくは、血小板類に関連している抗原に対して特異的な抗体／断片に、例えば、アミン基を誘導化させるためのヘテロ二官能性マレイミド・ヒドロキスクシンイミドエステルリンカーを使用し、その後、この誘導体と、2-イミノチオランのような試薬を使用して随意に導入されている遊離のスルフヒドリル基を有する断片との反応により、結合させることができる。二重特異的複合物形成のための開示に基づけば、別の方法での結合様式は、通常の当業者には簡単に理解されることであり、更に、それには、このような方法のほんの些細な変更及び改変のみが必要であると思われる。

本発明の様々な種類の三重特異的もしくは多重特異的抗体複合物には、血栓類及び肺動脈血栓類の検出のための、白血球類、及び、フィブリン及び血小板類と関連している抗原類に特異的な抗体／断片の複合物がある。他のこのような多重特異的複合物類は、当業者には簡単に理解できるものと思われる。

物が好ましい。好ましいものはFab'もしくは一本鎖の抗体形態のものであり、これらは、注入後に非常に高い病変部対血液比を達成させることにより、非常に迅速な標的化を可能にするものと思われる。従って、この改良により、この診断法は、患者が胸痛及びMIの他の兆候及び症状を認める場合、緊急用病室においても使用することができるようになるものと思われる。初期でのこの適用法は、抗ミオシン抗体類のみを使用したのでは、現在のところ実現可能となる状態ではない（Johnson and Seidin, Semin. Nucl. Med. 19:238-246, 1989）。

又、血栓類の検出のための白血球類及びフィブリン関連性抗原類に対して特異的な抗体／断片の複合物、血栓類の検出のための白血球類及び血小板関連性抗原類に対して特異的な抗体／断片の複合物、及び、血栓類及び塞栓類の検出のためのフィブリン及び血小板関連性抗原類に対して特異的な抗体／断片の複合物も含む。

請求の範囲において使用されている用語「多重特異的抗体・試薬複合体」、及び、「多重特異的複合物」は、二重特異的抗体・試薬複合体及び二重特異的複合物をも、それぞれ含む。

同様の反応類を利用して、例えば、Fabもしくは

単一特異的抗体もしくは抗体複合物を、診断に用いる造影用試薬としての用途のために、シンチグラム法造影用、もしくは、磁気共鳴造影増強用試薬のための放射性同位元素でラベル化する、あるいは、それらと複合体形成させる、あるいは、それらに対する複合化に適用させることができる。インビボにおける用途のためのラベル化用蛋白質類に適する任意の慣用的な放射性ラベル化法は、一般的には、複合物のラベル化に適していると思われる。これは、慣用的な技術もしくはより洗練された方法を使用して、例えば、ハロゲンもしくは金属イオンの放射性同位元素で直接ラベル化するか、あるいは、放射性金属もしくは常磁性イオンのためのキレート化剤を付着させることにより実行することができる。このようなキレート化剤、及び、抗体類にそれらを付着させる様式は、通常の当業者には良く知られており、かつ、中でも、例えば、Childs et al., J. Nuc. Med., 26:293 (1985);及び、Goldenbergの米国特許4,331,647、4,348,376、4,361,544、4,468,457、4,444,744、及び、4,624,846において開示されている。典型的なものは、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）及びジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）の誘導体類である。これらは、典型的には、キ

レート化剤を抗体に付着させることができる側鎖上の基を有している。別の方法では、キレート化剤上のカルボキシルもしくはアミン基を活性化させ、その後、良く知られた方法により、抗体複合物に対して共役化させることができる。例えば、Ga-67 のためのキレート化剤であるデフェロキサミンは遊離のアミン基を有しており、これを適切なリンカーで活性化させて、活性化されたカルボキシル、イソチオシアネート、もしくは、類似した基を保持させ、その後、抗体複合物上のアミン類に対して共役化させることができる。

このキレート化剤を、直接的に、あるいは、短いもしくは長い鎖状リンカー部分を介して、あるいは、例えば、アミン、カルボキシル、フェニル、チオール、もしくは、ヒドロシル基類のような、抗体上の1つもしくは複数の官能基類を介して抗体複合物に対して結合させることができる。様々な慣用的リンカー類を使用することができ、それらは例えば、ジイソシアン酸エステル類、ジイソチオシアン酸エステル類、カルボジイミド類、ビス・ヒドロキスクシニイミドエステル類、マレイミド・ヒドロキスクシニイミドエステル類、グルタルアルデヒド、及び、その類のものであり、好ましくは、米国特許4,680,338

において開示されている、イソチオシアネート無水物リンカーのような、選択的な繰り返し構造 (sequential) のリンカーである。

ヨード-131 (I-131) もしくはヨード-123 (I-123) のいずれかを使用するラベル化は、酸化的方法を使用すると簡単に行うことができ、この場合、放射活性を有するヨウ化カリウムもしくはナトリウムと抗体との混合物を、クロラミン-Tを使用して、例えば、Greenwood et al., Biochem. J., 89, 114 (1963) により報告されており、更に、McConahay et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 29, 185 (1969) により改変されているように処理する。これにより、結果的には、試薬類の性質及び反応条件に依存して、抗体分子上、おそらくはチロシン残基上、又多分トリプトファン及びフェニルアラニン残基上の水素原子とヨウ素原子との直接的な置換が生じる。別の方法では、Feleau、上述、ページ 303、及び、そこに参考文献として挙げられているものにより記載されているように、ラクトパーオキシダーゼのヨウ素化反応を使用することができる。

ラベル化のより進んだ幾つかの方法は、米国特許係属出願番号742,436 (85年7月6日)、084,544 (87年12月8

日)、及び、176,421 (88年1月4日) において開示されている。前述の特許及び特許出願の全ての開示類は、それら全体を、参考文献として本明細書内に取り込んである。広範囲にわたるラベル化技術類が、Feleau、「生物学及び医学におけるラベル化抗体 (Labeled Antibodies in Biology and Medicine)」、ページ 214-309 (McGraw-Hill Int. Book Co., New York et al., 1978) において開示されている。様々な金属性放射同位元素類の導入は、Wagner et al., J. Nucl. Med., 20, 428 (1976); Sundberg et al., J. Med. Chem., 17, 1304 (1974); 及び、Saba et al., J. Nucl. Med., 6, 542 (1976) の方法類に従って実行することができる。前述のものは、当業者に知られている、蛋白質類の放射性ラベル化の多くの方法を単に説明しているものである。

MRI 造影増幅のために有用な化合物の例には、例えば、Gd(III)、Eu(III)、Dy(III)、Pr(III)、Pa(IV)、Mn(II)、Cr(III)、Co(III)、Fe(III)、Cu(II)、Ni(II)、Ti(III)、及び、Y(IV) イオンのような常磁性イオン、あるいは、例えば、ニトロ酸化物類のようなラジカルがあり、このようなものは、常磁性イオンキレート化剤を保持している基質に対して複合体

形成させられているか、あるいは、例えば、イオン類に関しては、SH、NH₂、COOHのような、あるいは、ラジカル性付加物に関してはリンカー類のようなキレート化用官能基を露出させているものと思われる。無理なく達成できかつ患者の安全面及び装置の設計に適合する磁場強度を使用して、外部カメラによる検出を可能にさせるためには、MRI 増幅用試薬は充分な量で存在する必要がある。このような試薬類にとって必要なことは、媒質中の水分子に影響を与える試薬類について当業者には良く知られており、それらは、とりわけ、例えば、Pykell, Scientific American, 246:78 (1982); 及び、Rudge et al., Am. J. Radiol., 141:1209 (1987) において開示されている。

直接的に、あるいは、キレートの形態において金属を抗体中に導入するための同じような方法の多くのものは、梗塞性病変のための造影用試薬を形成させるための、本発明の抗体複合物中へのMRI 試薬類の導入に適していることは納得がゆくことである。MRI 試薬類は、有利なことに、造影を増幅するための数多くの常磁性イオン類もしくはラジカル類を有している。このようなイオン類の複数のものを導入するための一つの方法は、担体ポリマーにキレートを負荷し、この担体を抗体複合物に、

好ましくは、この複合物の抗体結合部位から遠く離れた部位に部位特異的に、結合させることである。この方法は、より多くの数のキレート化剤を、抗体上のより数少ない部位で抗体に付着することができ、このため、免疫反応性がひどく弱まるということがないという利点を有している。抗体にキレート化剤を負荷させるために有用なポリマー類の例には、例えば、ポリオール類、多糖類、ポリペプチド類、及び、その類のものがある。米国特許4,699,784 (Shib et al.)、及び、4,046,722 (Rowland) を参考にせよ。多糖のうちの1種類のものはデキストランである。キレート化剤を官能化させて、デキストランのヒドロキシルに対する反応基、例えば、無水化物類、イソシアン酸エステル類、もしくは、イソチオシアン酸エステル類、及び、その類のものを付加させることができる。別の方法では、デキストランを、例えば、アミノデキストランへの変換によるように、数多くの方法で誘導化させることができる。類似した方法が、複数の試薬分子類を、抗体もしくは抗体複合物上に負荷するために有用であると考えられることは評価に値すべきことであると思われる。更に、このことについては、より詳しく、本明細書のこれ以降の部分に討論してゆくつもりである。

その後、酸化させたデキストランを、ポリアミン、好ましくはジアミン、より好ましくはモノ-もしくはポリ-ヒドロキシジアミンと反応させる。適切なアミン類には、例えば、エチレンジアミン、プロピレンジアミン、もしくは、類似したポリメチレンジアミン類、ジエチレントリアミン、もしくは、類似したポリアミン類、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン、もしくは、他の類似したヒドロキシル化させたジアミン類、もしくは、ポリアミン類、あるいは、その類のものがある。アルデヒド基に比較すると余剰であるアミンを使用して、アルデヒド官能基を実質的に完全にSchiff塩基(イミン)基に変換することができる。

結果として生じる中間体の還元的安定化は、Schiff塩基中間体を、例えば、 NaBH_4 、 NaBH_3CN 、もしくは、その類のもののような還元用試薬と反応させることにより行うことができる。余剰な還元用試薬を使用して、イミン基が実質的に完全に第二アミン基に還元すること、及び、任意の未反応のアルデヒド基がヒドロキシル基に還元することを保障する。結果として生じる付加物を、慣用的なサイズふるいカラムを通すことにより更に精製させて、交差結合しているデキストランを除去すること

アミノデキストラン(AD)支持体を使用する抗体複合体の調製の方法は、通常は、デキストランポリマー、都合がよいものは、約10,000-100,000の平均分子量(MW)の、好ましくは、約10,000-40,000、更により好ましくは、約15,000のデキストランを使用して開始する。その後、このデキストランを酸化用試薬と反応させて、デキストランの炭水化物部分の調節的酸化を行い、アルデヒド基を産生する。この酸化は、慣用的な方法類に従い、例えば、 NaIO_4 のような解糖性化学試薬類を用いると簡便に行われる。

酸化用試薬の量を、約40,000の分子量のデキストランについては、約50-150、好ましくは100のアルデヒド基が産生され、他の分子量のデキストラン類についてもアルデヒド基がほぼ同じ割合になるように調節すると都合がよい。アルデヒド基、及び、その後に続くアミン基の数が多ければ多い程、都合が良くなるが、その理由は、ポリマーは今度はだんだんポリリシンのように作用してくるためである。数が減ってくるほど、キレート化剤もしくはボロン添加物の付加状態がだんだん好ましいものでなくなってくるという結果になり、これは不利なことになることがある。

AD上の有効なアミノ基の最初の数の推定は、重量を測定してある試料とトリニトロベンゼンスルホン酸との反応、及び、標準物を用いての、420nmにおける吸光密度の相関により行うことができる。この方法では、結果的に、通常では、算出された数のアルデヒド基がAD上の第一アミン基に本質的に完全に変換される。

別の方法では、デキストランを、例えば、臭化シアンと反応させ、その後にジアミンと反応させることによるような、アミン官能基を導入させるための慣用的な反応により誘導化させることができる。ADは、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)もしくはその水溶性誘導体を使用するなどする、慣用的手法により調製された、活性化された形態の特別な薬剤もしくはキレート化剤の誘導体、好ましくは、カルボキシル活性化させてある誘導体と反応させるべきである。

本発明のシンチグラム法用造影法は、哺乳類、好ましくはヒトに、非経口的に、放射能ラベル化した単一特異的もしくは多価特異的抗体-試薬複合体の、シンチグラム法用造影法に有効な量を注入することにより実行する。非経口的にということは、例えば、静脈内に、動脈内に、心膜腔内に、間質内に、もしくは

は、腔内にということの意味する。心臓血管病変の造影化ためには、静脈内もしくは動脈内投与が好ましい。被験者は、放射能ラベル化複合体の約1 μ Ciから50 μ Ciの用量で、特別の放射同位元素と投与方式との関数となる量を与えられることになることが予測される。静脈内もしくは動脈注入のためには、その量は、通常では、I-131の約2-10 μ Ci、好ましくは約2-5 μ Ci、I-123の約5-10 μ Ci、好ましくは8 μ Ci、Tc-99mの約10-40 μ Ci、好ましくは約20 μ Ci、In-111もしくはGa-67の約2-5 μ Ci、好ましくは約4 μ Ciである。

放射能ラベル化した単一特異的もしくは多重特異的抗体・試薬複合体は、哺乳類のための注入可能な調製物、好ましくは、ヒトのための滅菌した注入可能な調製物として、心臓血管病変に対してシンチグラム法用造影試薬を標的化するために、好ましくは、薬剤学的に容認される滅菌した注入可能な賦形剤中、好ましくは生理学的pH及び濃度においてリン酸緩衝化された食塩水（PBS）中に含まれる放射能ラベル化された複合体の有効量を含む滅菌した注入可能溶液を含んだ状態で都合良く提供される。

本発明に従って非経口的に投与するための代表的な調製物は、

磁気共鳴造影（MRI）は、造影用試薬類が、放射性同位体類よりはむしろMRI増幅用種を含んでいると思われることを除いては、シンチグラム法に類似した方法で行われる。磁気共鳴現象は、シンチグラム法とは異なる原理に基づいて作用するという事は評価に価するものと思われる。通常、発生するシグナルは、造影すべき領域内に存在する水分子の水素原子の核内にあるプロトンの磁気モーメントの緩和時間に相関する。この磁気共鳴造影増幅用試薬は緩和率を増大させることにより作用し、それにより、造影用試薬が付着している領域内の水分子と、体内のどこか別の所にある水分子との間の対比を増大させる。しかしながら、この試薬の効果は、 T_1 と T_2 の両方を増大させることであり、前者は対比をより大きくし、一方で後者は対比をより小さくする。従って、この現象は濃度依存性であり、かつ、通常は、最適効果のための、常磁性種の至適濃度が存在する。この至適濃度は、使用する特別の試薬、造影位置、造影用式、つまり、スピン・エコー、飽和・回復、転位・回復により、更に、他の数々のものについては、強い T_1 依存性もしくは T_2 依存性造影用技術、及び、その試薬が溶解しているもしくは懸濁している媒質の組成に伴って変化するもの

通常は、約0.1から20mg、好ましくは約0.5から2.0mgの放射能ラベル化された単一特異的もしくは多重特異的抗体・試薬複合体を、例えば、0.9%の塩化ナトリウムを含む0.04Mのリン酸緩衝液（pH7.4、BioWare社）のミリリットル当たり約10mgのヒト血清アルブミン（1% USP: Parke-Davis社）等も都合よく含んでいる滅菌溶液中に含んでいる。

一旦、充分量の同位元素が標的部位に沈積したら、慣用的なプレート式及び／又はSPECTガンマカメラのいずれかで、あるいは、心臓血管病変の位置を外側からもしくは内部から決定するために使用される携帯用ガンマ探索器の利用により走査を行うことができる。シンチグラムは、通常は、50-500KeVの範囲のエネルギーの検出のための、1つもしくは複数の窓を有するガンマ造影用カメラにより撮影する。標的部位は、比較的濃縮された病巣内に存在する任意の心臓血管病変であり得る。心臓血管病変の検出は、単一特異的もしくは多重特異的抗体・試薬複合体の、非経口的投与時に病変上に存在している白血球及び特異的標的抗原類との反応性を直接介して、又同様に、病変内へのラベル化白血球の侵入を介して行われるものと思われる。

と思われる。これらの因子、及び、それらの相対的な重要性は当業者に知られるところのものである。例えば、Pykell、前掲書、及び、Rangier et al.、前掲書、を参照せよ。

本発明のMRI法は、哺乳類、好ましくはヒトに、非経口的に、単一特異的もしくは多重特異的抗体複合体、及び、MRI増幅用試薬を含む本発明に記載されている複合体の、磁気共鳴造影化のための有効量を注入することにより実行される。被検体は、病変の部位におけるMRIシグナルを少なくとも約20%、好ましくは50-500%増幅させるのに充分な用量で、特別な常磁性種及び投与方式の関数となっている量のラベル化された複合体を与えられるものと推定される。

再び記載するが、ラベル化された抗体もしくは抗体複合体は、哺乳類のための注入可能な調製物、好ましくは、ヒトのための滅菌された注入可能な調製物として、心臓血管病変に対してMRI試薬を標的化させるために、好ましくは、薬剤学的に容認される滅菌された注入可能な賦形剤中、好ましくは生理学的pH及び濃度におけるリン酸緩衝化させた食塩水（PBS）中に含まれるラベル化された複合体の有効量を含む滅菌された注入可能な溶液を含んだ状態で好都合に提供される。非経口

的投与のための他の慣用的な薬剤学的に容認される賦形剤類は、非経口的投与の部位に必要なものとして利用することができる。

本発明に従って、非経口的に投与されるべき代表的な調製物は、通常では、約0.1から20mg、好ましくは約5mgのラベル化された多重特異的抗体・試薬複合体を、例えば、0.9%の塩化ナトリウムを含む0.04Mのリン酸緩衝液(pH 7.4、Bioex社)のミリリットル当たり約10mgのヒト血清アルブミン(1% USP; Parke-Davis社)等も都合よく含んでいる滅菌溶液中に含んでいる。一旦、充分なMRI試薬が標的部位に沈積したら、病変を造影するための慣用的なMRIカメラで走査を行うことができる。

本発明の好ましい実施態様においては、ラベル化した第1抗体・試薬複合体の局在化比を、ラベル化していない第2抗体の利用を介して増大させ、標的化されていない循環性複合体を除去しかつその浄化を増大させるが、それは、関連性を有する造影用試薬類について、Goldenberg、米国特許第4,624,846において開示されているのと同様に行ない、この開示は、その全体は参考文献として本明細書中に取り込まれている。用語「局在

化比」は、その慣用的な意味、つまり、標的の、非標的抗体複合体に対する比率、という意味で利用されている。一般的に、第2抗体は、第1抗体・試薬複合体の局在化比を、少なくとも約20パーセント、更に典型的には、50パーセントもしくはそれを上回る割合で増大させる量で使用する。

第2抗体は、第1抗体複合体に結合することが可能であり、第1抗体複合体自体よりもより迅速に循環系及び非標的空間から浄化される複合体を形成する限り、完全なIgGもしくはIgM、あるいは、IgGもしくはIgMの断片であることができる。第2抗体は、完全なIgGもしくはIgMであることが好ましい。第1抗体がIgGもしくはIgMの断片である場合には、第2抗体が完全なIgGもしくはIgMであって、そのため、第1/第2複合体が補体カスケードの活性化能力を保持していることが好ましい。それとは対比的に、第1抗体が完全なIgGである場合には、第2抗体は、複合体がやはり補体固定化能力を保持している場合は、断片であることができる。第1/第2対の内の少なくとも一つが完全なIgGもしくはIgMであることが好ましい。IgMを使用することの一つの利点は、それが、第1抗体、あるいは、キレート化用試薬及びその類のもののような、切り離された状

態の複合体類と、高分子量複合体を形成するということである。このことは、非標的の第1抗体及び/又は造影成分の特に血液からの浄化の比率及び有効性を増加させる。第2抗体は、前述のGoldenbergの'849特許において開示されている方法により調製することができる。モノクローナル抗IgG種も利用することができ、更に、これを、有利なことに、本方法においては第2抗体として使用している。例えば、放射性ヨード化させた結合基、もしくは、ニトロキシド類のような有機性の常磁性種等の非金属性複合体もやはり、これらに対して第2抗体が特異的であることが生じることがあり、このような目的のためにこれらを設計することもある。第2抗体を、第1抗体・試薬複合体の非経口的投与の後充分な時間が経過してから被検体内に注入すると、病変におけるそれらの最高摂取を可能にするが、これは、典型的には、最初の投与後約15分から約24時間の内のいずれかであり、好ましくは、投与後24-48時間である。第1抗体を静脈内投与しない場合には、第2抗体の少なくとも一部分を、同一の非経口的経路により投与すると有利であることがある。しかしながら、第2抗体の少なくとも一部分を静脈内に注入して、循環系内に既に拡散している第1抗体の浄化を増大させる

と有利である。通常では、造影用試薬複合体と浄化のための第2抗体の両方を、動脈内もしくは静脈内に投与するものと思われる。

導入される第2抗体の量は、一般的には、約0.3から約24時間以内に循環している第1抗体を10-85%減少させることができる量であると思われる。浄化に影響を与えると思われる、第1抗体に対する第2抗体の比率は、第1及び第2抗体対の結合特性に依存するものと思われる。インビトロにおける患者血液の予備スクリーニングを使用して、適切な比率の最初の評定値を提供することができる。このスクリーニングを使用して、例えば、ゲル拡散試験等における沈降帯バンドを取得するために必要な、第1抗体に対する第2抗体の比率を決定するものと思われる。これにより、第1抗体に対する第2抗体のモル比の一般的範囲が示され、この一般的範囲は、この比率のための、低い側の限界の尺度として働くものであるが、それは、このようなインビトロでの試験により示されているものに比較して、インビボにおける適用法は、第1抗体に対するより高い比率の第2抗体を必要とすることがあるためである。

実際には、第1抗体に対する第2抗体のモル比は、一般的に

は、約5-50の範囲内にあるが、この範囲は限定的なものと考えるべきではない。15-25、好ましくは20-25の、第1抗体に対する第2抗体のモル比は、第1及び第2抗体の両方が完全なIgGである場合に有利であることを発見している。

循環しているラベル化第1抗体を浄化し、かつ、第1抗体の局在化率を増強させるための第2抗体の用途は、前述のGoldenbergの特許並びにそこに掲載されている参考文献内に開示されているように、造影増幅化消去法技術類の利用により、より増幅化することができる。これは、当業者が認識している技術であり、この技術においては、独自の検出が可能な、放射性核種でラベル化した無関係な抗体もしくは断片を、非標的のバックグラウンドレベルを正常化させる用途のために注入する。この抗体は、実質的には、増幅化に必要な期間中、第1抗体と同一の拡散及び代謝動態を有する。このような抗体類の注入は、 ^{99m}Tc でラベル化した血清アルブミンのような慣用的な消去法用試薬類より好ましいものであるが、それにも関わらず、これらの試薬類は、バックグラウンドを補うということにより造影法を増強させる用途に適している。消去法用試薬としての放射能ラベル化した無関係な抗体の用途は、循環系からの抗体類の

片から調製する。鎖間ジスルフィド架橋を、軽・重鎖の関起こさないように注意しながら、注意深くシステインで還元して $\text{Fab}'\text{-SH}$ 断片を形成させる。一つの抗体のSH基を、過剰のビス・マレイミドリンカー（1, 1'-（メチレンジ-1, 4-フェニレン）ビスマレイミド、Aldrich Chemical Co.社, Milwaukee, WI）で活性化させる。第2モノクローナル抗体も $\text{Fab}'\text{-SH}$ に変換させ、その後、活性化させた第1抗体断片と反応させて、二重特異的複合物を取得する。この複合物を、2-イミノチオランと反応させて、1つもしくは複数のスルフヒドリル基を導入させるが、これは、先に記載したものと同一のビス・マレイミド活性化法を使用して、この複合物を第3抗体／断片にカップリングさせる用途、あるいは、例えば、還元した（例えば、 SnCl_2 で）過テクネチウム酸エステルからの ^{99m}Tc での直接的金属付加反応（metalation）での用途のためのものである。複合物の第3抗体は、他の2つのものの内の一つと同一の抗原特異性、あるいは、単球に対する特異性のよう、全く異なる特異性を有することができる。 ^{99m}Tc 、あるいは、造影に有用な他の数々の放射核種の内の一つ（例えば、100から500 keVの範囲内にあるもの）と複合対形成しているこの複

浄化に影響を与える組織からの非標的バックグラウンド放射のための、コンピューターにより算出される補正を可能にする。第1モノクローナル抗体、及び、消去法用試薬として利用される無関係な抗体は、同一の種もしくは骨髄腫／ハイブリドーマからのものであることが好ましく、それにより、第2抗体が、実質的に同一の割合で、標的化されていない領域から、第1モノクローナル抗体及び無関係な抗体免疫グロブリンを浄化するものと思われることは、当業者からの評価に値するものと思われる。第2抗体が、第1及び無関係な免疫グロブリン種の不変部に対して特異的であることが更に好ましい。

これらの複合体の標的選択性は、血栓類、塞栓類、アテローム性動脈硬化斑、及び、他のこのような心臓血管病変類に作用する薬剤類の有効性を立証する適用法を有するものと思われる。

実施例 1

多重特異的抗白血球／抗ミオシン複合体

二重特異的 $\text{F(ab}')_2$ 抗体断片複合物を、顆粒球細胞に対して極めて特異的であるモノクローナル抗体の Fab' 断片、及び、心筋ミオシンに対して特異的であるモノクローナル抗体の Fab' 断

片は、初期及び後期段階の心筋梗塞類を造影するのに有用である。

実施例 2

抗体混合物（カクテル）

実施例 1 において使用されたものと同一の抗体類を、初期及び後期の心筋梗塞類の改良型造影のために、抗体断片もしくは断片類の混合物類として投与することができる。

本実施例においては、抗ミオシン抗体（Khaw et al., *Circulation* 57:743-750, 1978; Khaw et al., *J. Clin. Invest.* 58:439-446, 1976; Khaw et al., *Hybridoma* 3:11-23, 1984, において記載されている）、好ましくは、Khaw et al. のモノクローナル抗体R11D10 Fab' （*Hybridoma* 3:11-23, 1984）を、抗顆粒球抗体 Fab' と混合させ、更に、その断片を、非経口投与のために ^{99m}Tc でラベル化する。この混合物により、実施例 1 の複合物に匹敵する結果を達成する。

実施例 3

心臓血管造影用抗体

抗白血球抗体、好ましくは、抗顆粒球抗体造影用試薬は、MCA 交差反応性抗体のような、ヒト顆粒球に対する選択性を有

するモノクローナル抗体から調製する。還元した過テクネチウム酸エステルからの $Tc-99m$ での殆ど即座のラベル化を可能にさせる目的で、抗体である抗-CEAを $Fab'-SH$ 断片に変換させ、更に、米国特許出願07/408,241に記載されているように、スズイオンと結合させる。この単独の抗体調製物を、アテローム性動脈硬化斑類、血栓類、及び、塞栓類のような数々の心臓血管病変を造影するために使用する。

実施例 4

シンチグラム法造影用キット

診断造影用キットは、実施例 1、2、もしくは、3 のチオールで活性化させた抗体（類）、及び、凍結乾燥化させた調製物の形態のスズイオンが含まれている、ゴム製のセブタムを有している第 1 滅菌バイアル瓶、及び、この調製物のラベル化及び注入のための、付加的な、セブタムに密封されている滅菌バイアル瓶及び滅菌された注射針を含む。

実施例 5

心筋梗塞の診断造影

再発性アンギナの病歴を有する 67 才の男性が緊急治療室に収容され、強い胸痛を訴え、かつ、混乱した状態にある。

は、0.2 μ g の用量であり、かつ、総計で 20 μ Ci の $Tc-99m$ でラベル化してある）を、左胸の静脈中に注入する。30 分後に撮影したプレート式造影 (planar image) は、右足のふくらはぎ部分における右腓骨静脈領域での放射活性の付着を明らかに証明している。放射活性の増大は身体他の領域においては観察されていない。次の日、対比静脈造影法により、後部腓骨静脈に限定された深部静脈血栓症の存在が確認されている。最初の抗体-造影検査の 3 日後に、同一の抗体混合物を投与したところ相同な造影所見が取得され、これにより、初期及び後期の両方の血栓症造影が実行可能であることが示された。

前述の実施例を、属性に関して、もしくは、特異性に関して記載されている反応物類、及び／又は、本発明の操作条件類を、前述の実施例において使用されているものについて置換して繰り返しても、同様に成功することができる。

前述の記載から、当業者は、本発明の主要な性質を簡単に確認することができ、かつ、本発明の精神及び範囲から逸脱することなしに本発明の様々な変更及び改変を行い、それを様々な利用法及び条件に適用させることができる。

胸痛の始まりは、約 40 分程前からである。この患者に 0.2 μ g (15 μ Ci の $Tc-99m$) の実施例 3 の調製物を静脈内注入し、患者の心臓を、30 分及び 2 時間後に再度行う、単一-プロトン放出コンピュータ算出式断層撮影法 (SPECT) による走査を行った。双方共の走査の際、左心室の先端領域において $Tc-99m$ の取り込みが見られ、2 時間目の走査からは表示度数が上昇していることが確実に示されたが、この領域は既により初期の段階に検出可能である。その後の ECG 変化により初期の梗塞が示唆されているが、これは、不規則な性質を示すため決定的な診断とはならない。タリウムを使用したその後の検査類により、心臓の同一領域における欠陥が示され、抗顆粒球抗体調製物により行われた非常に初期の検出を立証している。その後の ECG もやはり、造影による所見に矛盾しない、決定的な波長異常を示している。

実施例 6

深部静脈血栓症の診断造影

82 才の老人女性が右ふくらはぎの浮腫及び紅斑を示しており、直ちにヘパリン療法を施行した。抗顆粒球抗体 Fab' 、抗フィブリン抗体 Fab' 、及び、フィブリン断片 II の複合物混合物（各々

国際調査報告		International application No. PCT/US92/05311
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (IPC) : IPCS A61K 49/02 US CL : 424/1.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/819, 424/85.8, 424/85.9, 530/389, 402 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPAT, STN(CAS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	U.S.A. 4,925,648 (Hansen et al.) 15 May 1990.	1-54
A	U.S.A. 4,868,109 (Lansford), 19 September 1989.	1-54
A	U.S.A. 4,844,893 (Hosalk et al.) 24 July 1989.	1-54
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See parent family entries.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance "E" documents published on or after the international filing date "L" documents which may have priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reasons (as specified) "O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicant's claim or not to be considered for prior art "X" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to derive an inventive step when the document is considered in view of one or more other cited documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "A" documents numbered of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 AUGUST 1992		Date of mailing of the international search report 15 SEP 1992
Name and mailing address of the ISA/ Communications of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531		Authorized officer C. SAYALA
Examination No. NOT APPLICABLE		Telephone No. (703) 308-0450

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO, RU, SD, SE